

Posición evolutiva de caracoles terrestres peruanos (Orthalicidae) entre los Stylommatophora (Mollusca: Gastropoda)

Evolutionary position of Peruvian land snails (Orthalicidae) among Stylommatophora (Mollusca: Gastropoda)

Jorge Ramirez^{1,2}, Rina Ramirez^{1,2}, Pedro Romero^{1,2}, Ana Chumbe^{1,2}, Pablo Ramírez³

¹Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Email Jorge Ramirez: jolobio@hotmail.com

²Departamento de Malacología y Carcinología, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Av. Arenales 1256, Apartado 14-0434, Lima-14, Perú. Email Rina Ramirez: rina_rm@yahoo.com

³Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Resumen

Los géneros *Bostryx* y *Scutalus* (Orthalicidae: Bulimulinae) son endémicos de América del Sur y están principalmente distribuidos en la vertiente occidental de los Andes del Perú. El objetivo del presente trabajo fue evaluar su posición evolutiva dentro de los gastrópodos Stylommatophora basada en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Fueron obtenidas cuatro secuencias las que, junto con 28 de otros Stylommatophora disponibles en el GenBank, fueron alineadas con ClustalX. La reconstrucción filogenética se realizó mediante los métodos de Neighbor-Joining, Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. El alineamiento resultó en 371 sitios, con presencia de *indels*. Los dos géneros de la Familia Orthalicidae por primera vez incluidos en una filogenia molecular (*Bostryx* y *Scutalus*), formaron un grupo monofilético con otro miembro de la superfamilia Orthalicoidea (*Placostylus*), tal como lo obtenido con marcadores nucleares. Se discute también su relación evolutiva con otros caracoles terrestres.

Palabras claves: ADN mitocondrial, filogenia molecular, Orthalicoidea, *Bostryx*, *Scutalus*.

Abstract

The genera *Bostryx* and *Scutalus* (Orthalicidae: Bulimulinae) are endemics from South America. They are mainly distributed on the western slopes of the Peruvian Andes. The goal of the present work was to assess their evolutionary position among the stylommatophoran gastropods based on the 16S rRNA mitochondrial marker. Four sequences were obtained, and along with 28 sequences of other Stylommatophora retrieved from the GenBank, were aligned with ClustalX. The phylogenetic reconstruction was carried out using the methods of Neighbor-Joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian inference. The multiple sequence alignment had 371 sites, with indels. The two genera of the family Orthalicidae for the first time included in a molecular phylogeny (*Bostryx* and *Scutalus*), formed a monophyletic group along with another member of the superfamily Orthalicoidea (*Placostylus*), result that is comparable with that obtained with nuclear markers. Their evolutionary relationship with other land snails is also discussed.

Keywords: Mitochondrial DNA, molecular phylogeny, Orthalicoidea, *Bostryx*, *Scutalus*.

Presentado: 29/04/2009
Aceptado: 30/06/2009
Publicado online: 28/08/2009

Introducción

En la vertiente occidental de los Andes peruanos predominan las especies de caracoles terrestres de los géneros endémicos *Bostryx* y *Scutalus* (Orthalicoidea: Orthalicidae). La familia Orthalicidae se distribuye principalmente en la región Neotropical, con mayor diversidad en América del Sur (Breure, 1979). Otros géneros pertenecientes a la superfamilia Orthalicoidea habitan en Oceanía, como *Placostylus*, de la familia Placostylidae (Herbert & Mitchell, 2009).

El ADN mitocondrial es un componente clave para desarrollar estudios filogenéticos debido a su alta tasa de mutación, herencia materna y falta de recombinación (Avice 2000, 2004). El gen 16S rRNA ha sido usado en varios análisis filogenéticos por su función y distribución universal, facilidad de aislar y caracterizar, así como por contener tanto regiones altamente variables como conservadas (Palumbi 1996). Podemos mencionar a Chiba (1999) quien estudió la evolución de los moluscos de las islas del Pacífico. Ross (1999) encontró una relación entre la distancia genética y la distribución geográfica de *Discus macclintocki*. Ramírez (2004) evaluó las relaciones evolutivas entre moluscos de la costa peruana (género *Bostryx*) y cómo los eventos El Niño/Oscilación Sur afectan sus poblaciones.

Usando la información proporcionada por un segmento variable del gen mitocondrial 16S rRNA se pretende evaluar la posición evolutiva de los géneros *Bostryx* y *Scutalus* dentro de los Stylommatophora, en una filogenia molecular junto con *Placostylus*, como grupo hermano, y representantes de diversos géneros de moluscos terrestres pulmonados.

Materiales y métodos

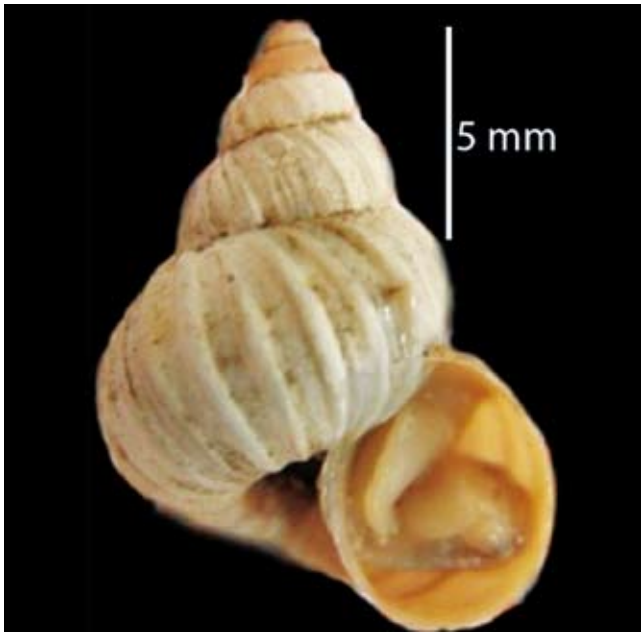
Tres especies de caracoles terrestres endémicos del Perú fueron capturados en tres ecosistemas de lomas (Tabla 1):

Phylum Mollusca
Clase Gastropoda
Subclase Pulmonata
Orden Eupulmonata
Suborden Stylommatophora
Infraorden Sigmurethra
Familia Orthalicidae
Bostryx sordidus (Fig. 1)
Bostryx scalariformis (Fig. 2)
Scutalus versicolor (Fig. 3)

Los especímenes de referencia fueron depositados en la colección científica del Departamento de Malacología y Carcinología

Tabla 1. Especies de caracoles terrestres de la Familia Orthalicidae consideradas en el presente estudio. Se indican la procedencia de las muestras así como el número de accesión de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA, depositadas en el GenBank.

Especie	Localidad en Perú	# Accesión
<i>Bostryx scalariformis</i> (Broderip, 1832)	Dept. Lima: Cerro de Agua, 11°22'17,5"S; 77° 26'22,6"W	FJ969796
<i>Bostryx sordidus</i> (Lesson, 1826)	Dept. Ancash: Lomas de Lupín, 10°24'79"S; 77°54'86"W	FJ969797
<i>Scutalus versicolor</i> (Broderip, 1832)	Dept. Ancash: Lomas de Mongón, 09°37'57,9"S; 78°16'41,5"W	FJ969798 FJ969799

Figura 1. *Bostryx scalariformis*Figura 2. *Bostryx sordidus*Figura 3. *Scutalus versicolor*

del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El DNA total fue aislado de músculo del pie usando una modificación del método de CTAB (Doyle y Doyle 1987). Un segmento variable del gen mitocondrial 16S rRNA fue amplificado por PCR usando *primers* y protocolos descritos por Ramírez (2004). Ambas hebras de los amplificados fueron secuenciadas usando los servicios de MacroGen Inc. USA. La edición manual de las secuencias fue realizada usando Chromas (McCarthy 1996); el ensamblaje de las secuencias consenso fue llevado a cabo mediante Cap3win (Huang y Madan 1999). Las secuencias fueron depositadas en el GenBank (Números de Acceso: FJ969796 - FJ969799).

Alineamiento múltiple de secuencias e inferencia filogenética

Las cuatro secuencias obtenidas, dos de *Bostryx* spp. y dos de *Scutalus versicolor*, fueron alineadas junto con otras 26 secuencias de Stylommatophora y dos de pulmonados no-Stylommatophora obtenidas en el GenBank (Tabla 2). De todas las secuencias del gen 16S rRNA disponibles, fueron seleccionados taxa representantes de caracoles pulmonados terrestres del suborden Stylommatophora (Wade et al. 2006); se encontró sólo una secuencia de la superfamilia Orthalicoidea, correspondiente a *Placostylus* (Placostylidae); las secuencias seleccionadas pertenecen tan solo al clado “no-achatinoideo” pues no se encontraban disponibles representantes del clado “achatinoideo”. Se usó a los dos pulmonados no-estilommatóforos (*Carychium minimum* y *Siphonaria pectinata*) como grupo externo. Originalmente fue usada sólo una secuencia por género de gastrópodo estilommatóforo, pero al observarse la inconsistencia de las posiciones de *Succinea*, *Mastus*, *Discus*, *Helix* y *Albinaria*, se procedió a agregar una y luego otra secuencia más, para corregir el efecto de “atracción de la rama larga” (*long branch attraction*) (Swofford et al. 1996).

El alineamiento múltiple de secuencias, llevado a cabo usando ClustalX 2.09 (Larkin 2007), fue corregido manualmente con la ayuda de Bioedit 6.0 (Hall 1999). El modelo de sustitución nucleotídica fue estimado mediante los programas Modeltest 3.7 (Posada y Crandall 1998) y MrModeltest 2.3 (Nylander 2004). La reconstrucción filogenética fue llevada a cabo con el uso del programa MEGA 4 (Tamura et al. 2007) para el método Neighbor-Joining (NJ), PAUP* 4.0b10 (Swofford 1998) para los métodos, Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML), y el programa Mr. Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001) para el método de reconstrucción filogenética por Inferencia Bayesiana (IB).

Para el análisis filogenético con el algoritmo de Neighbor-Joining, fue usado el modelo de *Maximum Composite Likelihood*. Para los análisis con Máxima Parsimonia se empleó un algoritmo de búsqueda heurístico obteniéndose el árbol inicial por adición secuencial (*stepwise addition*), utilizando el algoritmo de Bisección-reconexión de árboles (*Tree-Bisection-Reconnection*, TBR) para el intercambio de ramas (*Branch-swapping*). En ambos métodos fueron construidos árboles filogenéticos tanto sin considerar *gaps*, como considerándolos. Para el análisis de Máxima Verosimilitud en PAUP* se realizó una búsqueda heurística obteniéndose el árbol inicial por adición secuencial para luego realizar la adición de las secuencias por *AsIs* con cinco repeticiones; el algoritmo de TBR fue usado para el reajuste de topología (*Branch-swapping*). Para el análisis Bayesiano se usaron cuatro cadenas de un algoritmo de Cadena de Markov-Monte

Tabla 2. Especies, referencias y número de accesoión de las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas del GenBank.

Familia	Especie	Referencia	# Accesoión
Pulmonados Stylommatophora (Phylum Mollusca, Clase Gastropoda, Subclase Pulmonata, Orden Eupulmonata, Suborden Stylommatophora)			
Infraorden Orthurethra			
Chondrinidae	<i>Chondrina avenacea</i> (Bruguière, 1792)	Ketmaier et al., 2006	DQ305071
	<i>Solatopupa cianensis</i> (Caziot, 1910)	Ketmaier et al., 2006	DQ305070
Enidae	<i>Mastus cretensis</i> (Pfeiffer, 1846)	Parmakelis & Mylonas, 2004	AY485926
	<i>Mastus procox/hemmeni</i> Maassen, 1995	Parmakelis & Mylonas, 2004	AY485930
	<i>Mastus carneolus</i> (Mousson 1863)	Parmakelis & Mylonas, 2004	AY485928
Infraorden Elasmognatha			
Succineidae	<i>Succinea caduca</i> Mighels, 1845	Holland & Cowie, 2007	EF217262
	<i>Succinea caduca</i> Mighels, 1845	Holland & Cowie, 2007	EF217304
	<i>Succinea caduca</i> Mighels, 1845	Holland & Cowie, 2007	EF217264
Infraorden Sigmurethra			
Clausiliidae	<i>Albinaria discolor</i> (Pfeiffer, 1846)	Douris et al., 2007	DQ665354
	<i>Albinaria brevicollis</i> (Pfeiffer, 1850)	Douris et al., 2007	DQ665349
	<i>Albinaria turrita</i> (Pfeiffer, 1850)	Douris et al., 2007	DQ665362
Bradybaenidae	<i>Ainohelix editha</i> (Adams, 1868)	Teshima et al., 2003	AY137577
	<i>Acusta despecta</i> (Sowerby, 1839)	Teshima et al., 2003	AY137578
Polygyridae	<i>Lobosculum pustulosa</i>	Perez, 2004	DQ086017
	<i>Triodopsis vannostrandii</i> (Bland, 1875)	Perez, 2004	DQ085935
	<i>Millerelix mooreana</i> (Binney, 1858)	Perez, 2004	DQ085999
	<i>Praticolella</i> sp.	Perez, 2004	DQ098157
	<i>Polygyra cereolus</i> (Mühlfeld, 1816)	Perez, 2004	DQ086001
Endodontidae	<i>Daedalochila hippocrepis</i> (Pfeiffer, 1848)	Perez, 2004	DQ086005
	<i>Discus macclintocki</i> (Baker, 1928)	Ross, 1999	AF064438
	<i>Discus macclintocki</i> (Baker, 1928)	Ross, 1999	AF064437
Helicidae	<i>Discus macclintocki</i> (Baker, 1928)	Ross, 1999	AF064436
	<i>Helix aspersa maxima</i> (Taylor 1883)	Guiller et al., 2001	AF126143
	<i>Helix aspersa</i> Muller, 1774	Abdulmawjood & Buelte, 2001	AF434797
Placostylidae	<i>Helix pomatia</i> Linnaeus, 1758	Manganelli et al., 2005	AY741411
	<i>Placostylus bivaricosus</i> (Gaskon, 1855)	Ponder et al., 2003	AY165847
Pulmonado No-Stylommatophora (Phylum Mollusca, Clase Gastropoda, Subclase Pulmonata, Orden Eupulmonata)			
Carychiidae	<i>Carychium minimum</i> Muller, 1774	Klussmann-Kolb et al., 2008	EF489308
Pulmonado No-Stylommatophora (Phylum Mollusca, Clase Gastropoda, Subclase Pulmonata, Orden Basommatophora)			
Siphonariidae	<i>Siphonaria pectinata</i> (Linnaeus, 1758)	Okusu et al., 2003	AY377627

Carlo, por 25 millones de generaciones, muestreando cada 2500 generaciones. Un árbol consenso fue construido usando los últimos 1000 árboles (*burn-in*= 9001 muestras).

El soporte estadístico de los nodos de los árboles filogenéticos encontrados fue evaluado usando bootstrap, con 1000 remuestreos para el caso de NJ y MP, mientras que para el caso de Máxima Verosimilitud fueron 100. En el caso del análisis bayesiano, el soporte estadístico de los nodos fue proporcionado por las probabilidades posteriores.

A fin de comparar las topologías de los árboles obtenidos con los distintos métodos filogenéticos usamos las pruebas de Kishino-Hasegawa (KH) (Kishino y Hasegawa 1989) y Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira y Hasegawa 1999), en PAUP*. Se usó la opción “*fullopi*” para generar una prueba de distribución por el remuestreo del método de *log-likelihood* estimado (Kishino et al. 1990). Los valores de *log-likelihood* fueron estimados usando un modelo totalmente optimizado con un valor de *bootstrap* de 1000.

Resultados

Los cuatro amplificados del segmento del gen mitocondrial 16S rRNA para las especies de *Bostryx* y *Scutalus* de la región costera del Perú resultaron entre 328 y 331 pb. El alineamiento de ellas, junto con otras 26 secuencias del clado “no-achatinoideo” del Suborden Stylommatophora (Tabla 2) y de *Carychium* y

Siphonaria, resultó en 371 sitios con presencia de *indels*; 223 sitios fueron filogenéticamente informativos. El mejor modelo de sustitución nucleotídica para los datos fue el GTR+I+G con 0,9647 como parámetro alfa de la distribución gamma y 0,2712 como la proporción de sitios invariantes. Las frecuencias nucleotídicas fueron T=33,1, C=12,2, A=36,0 y G=18,7. La elección del mejor modelo y sus parámetros con el escogido por el programa Modeltest 3.7 fue coincidente con los hallados por el MrModeltest 2.3.

En todos los árboles encontrados, usando diversos métodos filogenéticos (NJ, MP, ML e IB), los géneros *Bostryx* y *Scutalus* (Familia Orthalicidae) quedaron más cercanamente relacionados entre sí y formaron un grupo monofilético con el género *Placostylus* (Placostylidae), conformando la Superfamilia Orthalicoidea, con valores de *bootstrap* mayores a 90% (Fig. 4 y 5).

El clado Orthalicoidea quedó en posición basal entre los gastrópodos estilommatóforos, en las topologías de NJ (Fig. 4A) y ML (Fig. 5B); sin embargo, los otros clados tienen muy bajo soporte estadístico, por lo que la posición de Orthalicoidea sería incierta. Caso similar sucede en las topologías encontradas con MP (Fig. 4B) e IB (Fig. 5A). Al realizar la comparación de todas las topologías por las pruebas de KH y SH se obtuvo como la más correcta a la obtenida por el método filogenético de Máxima Verosimilitud, seguida por la obtenida mediante Neighbor-Joining.

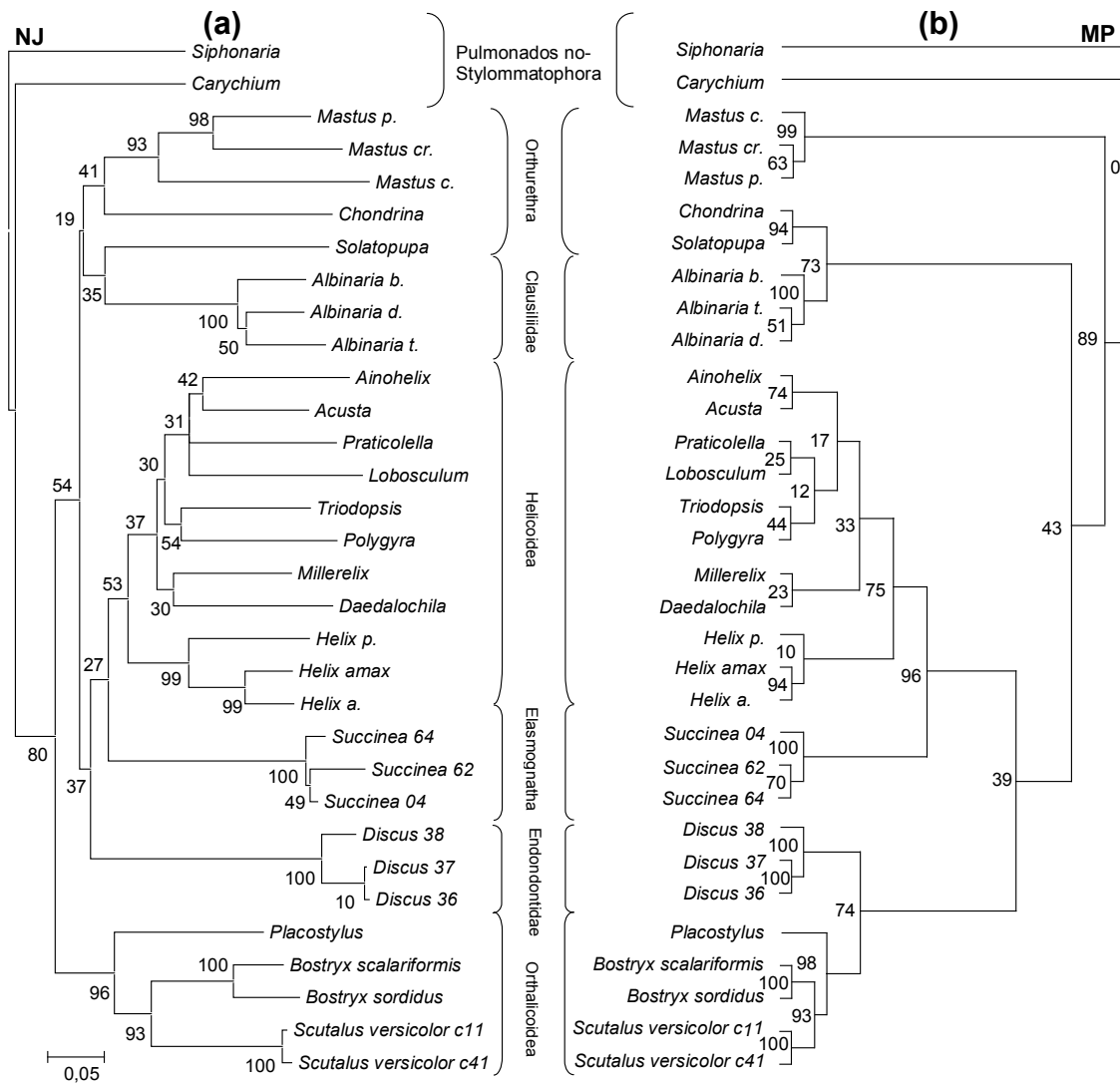


Figura 4. Árboles filogenéticos para el marcador mitocondrial 16S rRNA. (a): Topología obtenida usando NJ considerando *gaps*. (b): Topología obtenida usando MP considerando *gaps* como "nuevo estado". Los números corresponden a valores de *bootstrap*. La escala corresponde al número de sustituciones por sitio. Note los altos valores de *bootstrap* para el grupo monofilético conformado por *Bostryx* y *Scutalus* (Familia Orthalicoidea), dentro del clado de la superfamilia Orthalicoidea.

Discusión

El presente estudio incluyó a dos géneros principales de la Familia Orthalicoidea (*Bostryx* y *Scutalus*) en una filogenia basada en el marcador mitocondrial 16S rRNA, que contuvo 30 secuencias de representantes del clado "no-achatinoideo" (Wade et al. 2001, 2006) de gastrópodos terrestres del Suborden Stylommatophora, y a dos pulmonados no-Stylommatophora como grupo externo. Estudios previos, usando el mismo marcador mitocondrial, en los gastrópodos Euthyneura, encontraron a los gastrópodos Pulmonados (*Amerianna carinata*, *Lymnaea stagnalis*, *Albinaria turrita* y *Cepaea nemoralis*) formando un clado, aunque con bajo valor de bootstrap (<60%) (Thollesson 1999). Grande et al. (2004), al usar los genes 16S rRNA y COI en una filogenia de la Clase Gastropoda, incluyendo cinco especies de Stylommatophora (*Rumina decollata*, *Elona quimperiana*, *Helix aspersa*, *Cepaea nemoralis* y *Albinaria coerulea*), encontraron que Pulmonata no era un grupo monofilético, pero que los pulmonados terrestres estilommatóforos sí tenían una naturaleza monofilética. Recientemente, este último resultado ha sido corroborado usando genes nucleares (18S rRNA y 28S rRNA) y mitocondriales (16S rRNA y COI) (Klussmann-Kolb 2008). Wade et al. (2001; 2006), usando marcadores nucleares (extremo 3' del gen 5.8S

rRNA, ITS-2, y el extremo 5' del gen 28S rRNA) para el análisis filogenético de gastrópodos Pulmonados, encontraron al grupo monofilético Stylommatophora formando dos clados, que nombraron como el clado "no-achatinoideo", donde se agruparon la mayoría de familias, y el clado "achatinoideo". Los géneros de la Superfamilia Orthalicoidea utilizados por ellos [*Placostylus* (Placostylidae), *Bulimulus* y *Drymaeus* (Orthalicoidea) y *Gaeotis* (Amphibulimidae)] formaron un grupo monofilético dentro del clado "no-achatinoideo". En el presente estudio, usando el marcador mitocondrial 16S rRNA, los dos géneros de la Familia Orthalicoidea por primera vez incluidos en una filogenia molecular (*Bostryx* y *Scutalus*), formaron un grupo monofilético con *Placostylus*. Asimismo, entre los Stylommatophora "no-achatinoideos" usados en los análisis se formó también el clado Helicoidea, aunque con bajo sustento estadístico. Por otro lado, si bien las secuencias de *Albinaria* (Familia Clausiliidae) formaron un clado independiente en la topología de MP, en los árboles filogenéticos obtenidos por NJ, IB y ML quedó junto con los Orthurethra; ello puede deberse a que la filogenia del presente estudio no incluye representantes de los Arionoidea ni Limaicoidea, que se posicionan entre los clados de los Orthurethra y Clausiliodea en la filogenia nuclear (Wade et al., 2006).

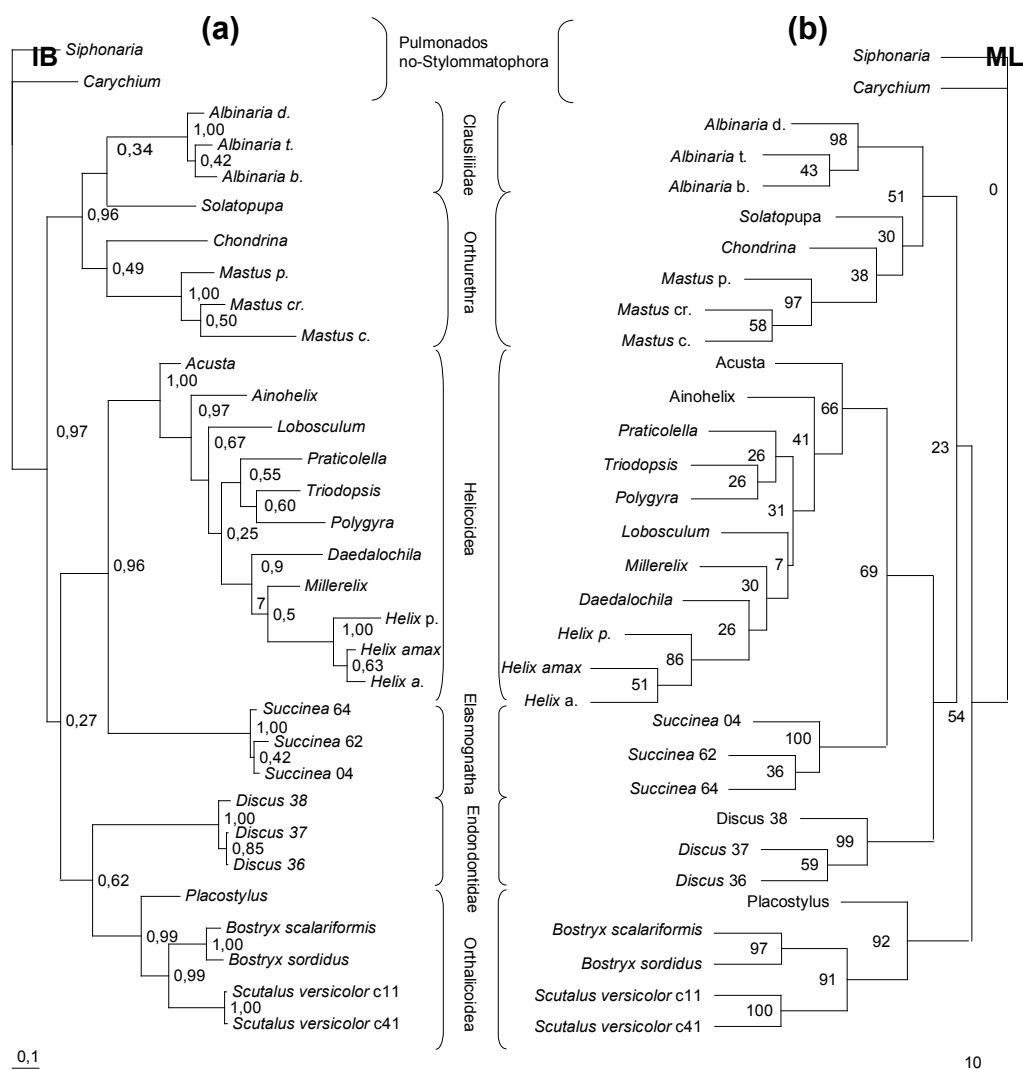


Figura 5. Árboles filogenéticos obtenidos usando IB (a) y ML (b), para el marcador mitocondrial 16S rRNA. Los números corresponden a valores de probabilidades posteriores bayesianas (a) y a *bootstrap* (b). La escala corresponde al número de sustituciones por sitio. Note los altos valores para el grupo monofilético conformado por la Superfamilia Orthalicoidea.

Sobre la base de marcadores nucleares ha sido demostrado que los caracoles anfibios del género *Succinea* (Elasmognatha) forman parte de los pulmonados estilommatóforos; Tillier et al. (1996) usaron el gen 28S rRNA y Dutra-Clarke et al. (2001) el gen 18S rRNA. Wade et al. (2006) encontraron que los Elasmognatha *Succinea* y *Athoracophorus* forman un grupo monofilético bien soportado dentro del clado “no-achatinoideo”. En el presente estudio también es soportada la posición de *Succinea* dentro del clado de moluscos pulmonados estilommatóforos; sin embargo, usando el marcador mitocondrial 16S rRNA, la posición de la Familia Succineidae difiere de la nuclear en que no está cercanamente relacionada a Orthalicoidea sino más bien a Helicoidea. Ello se debería al hecho de no estar presente *Athoracophorus* en el análisis, ambos del Infraorden Elasmognatha, lo que estaría haciendo que quede bajo el efecto de “atracción de la rama larga”, lo que significa que su posición varía debido a que sus secuencias son tremendamente divergentes en relación a las otras usadas en el análisis filogenético (Swofford et al. 1996).

Las relaciones evolutivas dentro de los distintos grupos de Stylommatophora aun permanecen inciertas, debido al alto nivel de homoplasia que presenta este grupo, probablemente debido a una radiación explosiva en tiempos recientes (Tillier et al. 1996).

Usando la información proporcionada por las secuencias inéditas de 16S rRNA de *Bostryx* y *Scutalus*, en este trabajo se corrobora la naturaleza monofilética de la Familia Orthalicoidea y la Superfamilia Orthalicoidea, como parte del clado “no-achatinoideo” de los gastrópodos terrestres del Suborden Stylommatophora, así como la eficacia del marcador mitocondrial 16S rRNA para resolver relaciones evolutivas profundas.

Agradecimientos

El presente trabajo es parte de proyectos del Instituto de Investigación en Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” (ICBAR) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Cód. 051001071 y 061001071). Estuvo financiado por la UNMSM, mediante el Vicerrectorado de Investigación y su Consejo Superior de Investigación.

Literatura Citada

Abdulmawjood A. & M. Bülte. 2001. Snail Species Identification by RFLP-PCR and Designing of Species-Specific Oligonucleotide Primers. *Journal of Food Science* 66 (9): 1287-1293.
 Avise J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
 Avise J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Breure A. 1979. Systematics, phylogeny and zoogeography of Bulimulidae (Mollusca). *Zoologische Verhandlungen* 168: 1-215.
- Chiba S. 1999. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin Islands. *Evolution* 53: 460-471.
- Douris V., S. Giokas, D. Thomaz, R. Lecanidou, & G. Rodakis. 2007. Inference of evolutionary patterns of the land snail *Albinaria* in the Aegean archipelago: Is vicariance enough?. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (3): 1224-1236.
- Doyle J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dutra-Clarke A., C. Williams, R. Dickstein, N. Kaufer & J. Spolita. 2001. Inferences on the phylogenetics relationships of Succineidae (Mollusca, Pulmonata) based on the 18S rRNA gene. *Malacologia* 43: 223-236
- Grande C., J. Templado, J. Cervera & R. Zardoya. 2004. Molecular Phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution* 21(2): 303-313.
- Guiller A., M. Coutellec-Vreto, L. Madec, & J. Deunff. 2001. Evolutionary history of the land snail *Helix aspersa* in the Western Mediterranean: preliminary results inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 10 (1): 81-87.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Herbert D & A. Mitchell. 2009. Phylogenetic relationships of the enigmatic land snail genus *Prestonella* - the missing African element in the Gondwanan superfamily Orthalicoidea (Mollusca: Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society* 96: 203-221.
- Holland B. & R. Cowie. 2007. A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845). *Molecular Ecology* 16 (12): 2422-2435.
- Huang X. & A. Madan. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research* 9: 868-877.
- Huelsenbeck J. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755
- Ketmaier V., F. Giusti, & A. Caccone. 2006. Molecular phylogeny and historical biogeography of the land snail genus *Solatopupa* (Pulmonata) in the peri-Tyrrhenian area. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (2): 439-451.
- Kishino H. & M. Hasegawa. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *Journal of Molecular Evolution* 29: 170-179.
- Kishino H., T. Miyata & M. Hasegawa. 1990. Maximum likelihood inference of protein phylogeny and the origin of chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution* 30: 151-160.
- Klussmann-Kolb A., A. Dinapoli I, K. Kuhn, B. Streit & C. Albrecht. 2008. From sea to land and beyond – New insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *BMC Evolutionary Biology* 8:57.
- Larkin M., G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. Thompson, T. Gibson & D. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Manganelli G., N. Salomone, & F. Giusti. 2005. A molecular approach to the phylogenetic relationships of the western palaeartic Helicoidea (Gastropoda: Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society*. 85 (4): 501-512.
- McCarthy C. 1996. Chromas: version 1.3. Griffith University, Brisbane, Australia.
- Nylander J. 2004. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Okusu A., E. Schwabe, D.J. Eernisse & G. Giribet. 2003. Towards a phylogeny of chitons (Mollusca, Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. *Organisms Diversity & Evolution* 3 (4): 281-302.
- Palumbi R. 1996. Nucleic Acids II: The polymerase Chain Reaction. In: Hillis, D., C. Moritz & B. Mable, eds.: *Molecular Systematics*. pp. 205-247.
- Parmakelis A. & M. Mylonas. 2004. Dispersal and population structure of two sympatric species of the Mediterranean land snail genus *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 83: 131-144.
- Perez K. 2004. Systematic Relationships within the Genus *Praticolella* (Gastropoda: Pulmonata: Polygyridae) from the Southern United States & Mexico. Centenary Research Grant Report, Bulletin of the Malacological Society of London 42: 5.
- Ponder W., D. Colgan, D. Gleeson, & G. Sherley. 2003. The relationships of *Placostylus* from Lord Howe Island. *Molluscan Research* 23: 159-178.
- Posada D. & K. Crandall 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Ramírez R. 2004. Sistemática e Filogeografia dos Moluscos do Ecossistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru. Tese de Doutorado em Zoologia. Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Ross T. 1999. Phylogeography and conservation genetics of the Iowa Pleistocene snail. *Molecular Ecology* 8(9): 1363-1373.
- Shimodaira H. & M. Hasegawa. 1999. Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1114-1116.
- Swofford D. 1998. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b8a. Sunderland, MA: Sinauer.
- Swofford D., G.J. Olsen, P.J. Waddell & D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. In: D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable, eds. *Molecular Systematics*. 2nd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates. Pp. 407-514.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Teshima H., A. Davison, Y. Kuwahara, J. Yokoyama, S. Chiba, T. Fukuda, H. Ogimura, & M. Kawata. 2003. The evolution of extreme shell shape variation in the land snail *Ainohelix editha*: a phylogeny and hybrid zone analysis. *Molecular Ecology* 12 (7): 1869-1878.
- Tholleson M. 1999. Phylogenetic analysis of *Euthyneura* (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene: use of a ‘fast’ gene for ‘higher-level’ phylogenies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 266: 75-83.
- Tillier S., M. Masselot & A. Tillier. 1996. Phylogenetic relationships of the pulmonate gastropods from rRNA sequences, and tempo and age of the stylommatophoran radiation. In: Taylor, J.D., ed.: *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford: Oxford University Press, 267-284.
- Wade C., P. Mordan & B. Clarke. 2001. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 268: 413-422.
- Wade C., P. Mordan, & F. Naggs. 2006. Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society* 87(4): 593-610.